

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

2/5/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

002564873

WPI Acc No: 1980-82897C/198047

Liposome(s) with oil membranes contg. phospholipid - have better flexibility and slower release rate and may be used in admin. of insulin, hormones, prostaglandin(s), antibiotics, enzymes etc.

Patent Assignee: KUREHA KAGAKU KOGYO KK (KURE )

Inventor: WATANABE K

Number of Countries: 005 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3016976	A	19801113				198047 B
GB 2050287	A	19810107				198102
JP 55153713	A	19801129				198106
FR 2455458	A	19810102				198109
GB 2050287	B	19830420				198316
CA 1143656	A	19830329				198319
JP 90040644	B	19900912	JP 7954283	A	19790502	199040

Priority Applications (No Type Date): JP 7954283 A 19790502

Abstract (Basic): DE 3016976 A

Liposomes consist of a wall membrane boased on phospholipids (I) enclosing  $\geq 1$  physiologically active substance. The all structure includes  $\geq 1$  oily substance (II), confined between a bimolecular layer of (I), and (II) is 3-20 wt.% on (I). Most pref. (I) is a lecithin and (II)  $\geq 1$  of mineral oil, waxes of triglycerides; esp. crude lecithin is used. Liposomes contg. (II) have better flexibility and pliability than those from pure (I) and release their active ingredient more slowly.

Title Terms: LIPOSOME; OIL; MEMBRANE; CONTAIN; PHOSPHOLIPID; FLEXIBLE; SLOW ; RELEASE; RATE; ADMINISTER; INSULIN; HORMONE; PROSTAGLANDIN; ANTIBIOTIC; ENZYME

Index Terms/Additional Words: ANTITUMOUR; AGENT; EGG; YOLK; SOY; LECITHIN; CHOLESTEROL

Derwent Class: B07

International Patent Class (Additional): A61K-009/00; A61K-037/22; B01J-013/02

⑤

Int. Cl. 3:

**B 01 J 13/02**

⑫

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

A 61 K 9/00

**DEUTSCHES**



**PATENTAMT**

**Behörden Eigentum**

**DE 30 16 976 A 1**

⑪

# **Offenlegungsschrift 30 16 976**

⑫

Aktenzeichen:

P 30 18 976.7-43

⑬

Anmeldetag:

2. 5. 80

⑭

Offenlegungstag:

13. 11. 80

⑮

Unionspriorität:

⑮ ⑯ ⑰

2. 5. 79 Japan P 54283-79

⑱

Bezeichnung:

Liposom mit einem Gehalt an einer aktiven Substanz und Verfahren zu dessen Herstellung

⑲

Anmelder:

Kureha Kagaku Kogyo K.K., Tokio

⑳

Vertreter:

Deufel, P., Dipl.-Chem. Dipl.-Wirtsch.-Ing. Dr.rer.nat.;  
Schön, A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Heitel, W., Dipl.-Phys.; Pat.-Anwälte,  
8000 München.

㉑

Erfinder:

Watanabe, Kozyu, Sakado, Saitama (Japan)

Prüfungsantrag gem. § 28 b PatG ist gestellt

**DE 30 16 976 A 1**

MÜLLER-BORÉ · DEUFEL · SCHÖN · HERTEL  
PATENTANWÄLTE

3016976

DR. WOLFGANG MÖLLER-BORÉ  
(PATENTANWALT VON 1927 - 1978)  
DR. PAUL DEUFEL, DIPL.-CHEM.  
DR. ALFRED SCHÖN, DIPL.-CHEM.  
WERNER HERTEL, DIPL.-PHYS.

ZUGELASSENE VERTRETER BEIM EUROPÄISCHEN PATENTAMT  
REPRESENTATIVES BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE  
MANDATAIRES AGRÉÉS PRÈS L'OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS

D/R/Hf - K 1473

- 2. Mai 1980

Kureha Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha  
Tokyo, Japan

Liposom mit einem Gehalt an einer aktiven Substanz  
und Verfahren zu dessen Herstellung

Patentansprüche

1. Liposom mit einer Wandmembran auf Phospholipidbasis, das mindestens eine physiologisch aktive Substanz in Liposombläschen eingeschlossen enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die Wandmembran eine Struktur aufweist, in der Moleküle aus mindestens einer öligen Substanz innerhalb einer bimolekularen Schicht aus Phospholipid in einer Menge von 3 bis 20 Gew.%, bezogen auf Phospholipid, vorliegen.
2. Liposom nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Phospholipid aus Lecithin besteht.

030046/0850

3. Liposom nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die ölige Substanz oder das Gemisch aus mindestens zwei öligen Substanzen aus Mineralölen, Wachsen und/oder Triglyceriden besteht.
4. Liposom nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Wandmembran Rohlecithin, das mindestens 3 Gew.% mindestens einer öligen Substanz enthält, aufweist.
5. Zubereitung zur Herstellung von Liposomen nach den Ansprüchen 1 bis 4, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Phospholipid, mindestens einer öligen Substanz und mindestens einer physiologisch aktiven Substanz.
6. Zubereitung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die ölige Substanz oder das Gemisch aus mindestens zwei öligen Substanzen aus Mineralölen, Wachsen und/oder Triglyceriden besteht.
7. Verfahren zur Herstellung von Liposomen mit einer Wandmembran auf Phospholipidbasis, bei dem in bekannter Weise mindestens eine physiologisch aktive Substanz im Liposombläschen eingeschlossen wird, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Phospholipid einsetzt, mit dem Moleküle aus mindestens einer öligen oder Fettsubstanz vermischt oder an das derartige Moleküle gebunden sind, und den Gehalt an öligem oder Fettsubstanz so steuert, daß in der gebildeten Wandmembran 3 bis 20 Gew.% derselben vorliegen.

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen angegebenen Gegenstand, wobei es sich bei den in den Liposomen eingeschlossenen aktiven Substanzen insbesondere um physiologisch aktive Substanzen handelt.

Bei der direkten Applikation einer physiologisch aktiven Substanz, z.B. eines Arzneimittels in einen lebenden Körper treten bisher oftmals verschiedene Probleme auf, z.B. immunologische Probleme durch Bildung des Antikörpers gegen das Arzneimittel innerhalb des behandelten Körpers, ausgeprägte Nebenwirkungen des Arzneimittels, die von einer Aufnahme des Arzneimittels durch andere Gewebe als diejenigen, die das Arzneimittel erreichen soll, herrühren, oder umgekehrt Probleme, die dadurch verursacht werden, daß das Arzneimittel das angestrebte Gewebe nicht zu passieren vermag, und schließlich auch Probleme aufgrund der Unfähigkeit des Arzneimittels, seine Aktivität beizubehalten, da es durch Enzyme innerhalb des lebenden Körpers abgebaut, inaktiviert und anderweitig beeinträchtigt wird.

Es ist jedoch ersichtlich, daß die aufgezeigten Probleme lösbar sind durch Verabreichung der physiologisch aktiven Substanz, z.B. eines Arzneimittels, auf einem Träger, der befähigt ist, die aktive Substanz direkt in das angestrebte Gewebe innerhalb des lebenden Körpers zu überführen und die aktive Substanz dabei schützt.

Unter Berücksichtigung dieses Gesichtspunkts wird in der japanischen Patentveröffentlichung 118826/74 (DE-OS 22 49 552) ein Liposom vorgeschlagen, das ein Bläschen, also einen Innenhohlraum, mit einer geschlossenen lamellaren Struktur (Micelle)

aufweist, die aus mindestens einer bimolekularen Schicht besteht, welche aus einer Verbindung der allgemeinen Formel X-Y gebildet ist, worin bedeuten X eine polare und hydrophile Gruppe, z.B. Phosphat, Carboxyl, Amino, Hydroxyl oder Cholin, und Y eine nicht-polare und hydrophobe Gruppe, z.B. Alkyl, Alkenyl oder Alkynyl, wobei es sich z.B. um ein gereinigtes Phospholipid wie Lecithin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin und dergleichen handelt, als Material zur Bildung der Membran der angegebenen Schicht, und wobei eine physiologische aktive Substanz, gelöst in einer wässrigen Lösung, innerhalb des Bläschens des Liposoms vorliegt. Da die das Liposom bildende Wandmembran die aktive Substanz in der wässrigen Lösung innerhalb des Bläschens selbst unter harten Bedingungen, z.B. solchen, wie sie im Gastrointestinaltrakt herrschen, schützt, wird die Aktivität der aktiven Substanz nicht nachteilig beeinflusst, selbst wenn das Liposom oral verabreicht wird. Da sich außerdem die Permeabilität des Liposoms für ein Gewebe des lebenden Körpers je nach dessen Partikelgröße (Durchmesser) ändert, besteht die Möglichkeit, die Permeabilität des Liposoms in das Gewebe durch Steuerung des Durchmessers des Liposoms zu erhöhen.

Das angegebene Liposom fand daher Beachtung als mögliches Mittel zur selektiven Zuführung einer in dem Liposom enthaltenen physiologisch aktiven Substanz in ein bestimmtes Gewebe eines lebenden Körpers.

Die das angegebene Liposom bildende Wandmembran, die aus reinem Phospholipid besteht, hat jedoch den Nachteil, daß sie nicht geschmeidig genug ist und eine unzureichende mechanische Festigkeit besitzt. Hinzu kommt, daß die in dem Bläschen enthaltene physiologisch aktive Substanz mit zu hoher Ausflußgeschwindigkeit nach außen angegeben wird, so daß sich

das Liposom auch nicht als völlig zufriedenstellend erweist in Bezug auf die geforderte Eigenschaft, die physiologisch aktive Substanz in den lebenden Körper langsam freizusetzen, wobei es sich um die sogenannte Freisetzungverzögerungseigenschaft handelt. Ein besonderer Nachteil des angegebenen Liposoms ist auch der, daß die Ausflußgeschwindigkeit der aktiven Substanz stark erhöht wird bei einer Temperatur oberhalb der Übergangstemperatur der Wandmembran, welche das Liposom bildet.

Zur Verbesserung der Festigkeit der Wandmembran des angegebenen Liposoms ist ein Verfahren bekannt, bei dem ein Steroidlipid, z.B. Cholesterin, mit dem Phospholipid vermischt wird, um das zur Bildung der Membranschicht des Liposoms dienende Material herzustellen. Obwohl die Festigkeit der das Liposom bildenden Wandmembran dadurch etwas verbessert wird, erfolgt kaum eine Verbesserung der sogenannten Freisetzungverzögerungseigenschaft.

Ein gründliches Studium der bekannten Verfahren zur Bildung eines Liposoms mit einer festen Wandmembran und einer vorteilhaften Freisetzungverzögerungseigenschaft der physiologisch aktiven Substanz in den lebenden Körper führte zu der Erkenntnis, daß die Wandmembran eines Liposoms, welches mit Hilfe eines Phospholipids, das Moleküle einer öligen Substanz enthält, z.B. mit Hilfe von "Rohlecithin", gebildet ist, eine höhere Geschmeidigkeit und Biegsamkeit aufweist und weitaus vorteilhafter ist in Bezug auf Freisetzungverzögerungseigenschaft der physiologisch aktiven Substanz in den lebenden Körper im Vergleich mit einer Wandmembran eines üblichen bekannten Liposoms, das unter Verwendung von gereinigtem Phospholipid gebildet ist. Überraschenderweise besitzt somit ein erfindungsgemäß hergestelltes Liposom, das unter Verwendung eines Phospholipids gebildet ist, welches Moleküle einer öligen Substanz enthält, alle wünschenswerten speziellen Eigenschaften.



Erfindungsgemäß wird somit ein eine physiologisch aktive Substanz enthaltendes Liposom geschaffen, dessen Wandmembran fest genug ist und das darüberhinaus eine besonders vorteilhafte Eigenschaft in Bezug auf langsames Freisetzen der aktiven Substanz in den lebenden Körper besitzt.

Die Erfindung wird durch die beigefügte Zeichnung näher veranschaulicht, in der darstellen:

Figur 1 eine schematische Wiedergabe des erfindungsgemäßen Liposoms,

Figur 2 die Abhängigkeit zwischen der Menge an Molekülen von öligler Substanz, die in dem Membranmaterial enthalten ist, das zur Bildung des erfindungsgemäßen Liposoms dient, welches im Liposombläschen Glukose in wässriger Lösung enthält, und dem Prozentgehalt an innerhalb des Bläschens enthaltender Glukose zur Gesamtmenge an Glukose, welche zur Bildung des mit Glukose beladenen Liposoms verwendet wurde (kurz Einschlußrate genannt).

Figur 3 einen Vergleich der Permeabilität der Glukose aus dem erfindungsgemäßen Liposom und einem gemäß Vergleichsbeispiel hergestellten Liposom,

Figur 4 einen Vergleich der Dauer der hypoglykämischen Wirkung von Insulin im lebenden Körper, das mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Liposoms, welches Insulin eingeschlossen enthält, bzw. mit Hilfe eines Liposoms gemäß Vergleichsbeispiel, welches ebenfalls Insulin eingeschlossen enthält, appliziert wurde,

Figuren 5 bis 8 die graphische Auswertung von Ergebnissen, welche die langsame Freisetzung (Freisetzungverzögerungseigenschaft) einer in erfindungsgemäßen Liposomen eingeschlossenen aktiven Substanz zeigen, wobei wiedergegeben ist,

- in Figur 5 die Änderung der Menge an Radioisotop im Blut mit der Zeit ab subcutaner Injektion eines Liposoms, das unter Verwendung dieser Substanz, die jedoch radioaktiv markiert wurde, als aktive Substanz gewonnen ist,
- in Figur 6 die Änderung der Menge an Radioisotop im Urin mit der Zeit ab subcutaner Injektion wie in Figur 5,
- in Figur 7 die im Verlaufe der Zeit erfolgende Änderung der Restmenge an Radioisotop an der Stelle, wo die freie radioaktiv markierte aktive Substanz direkt subcutan injiziert wurde, und
- in Figur 8 die im Verlaufe der Zeit erfolgende Änderung der Restmenge an Radioisotop an der Stelle, wo das Liposom, welches im Liposombläschen die radioaktiv markierte aktive Substanz eingeschlossen enthält, subcutan injiziert wurde.

Das erfindungswesentliche Merkmal ist darin zu sehen, daß bei der Bildung eines Liposoms, das eine aktive Substanz im Liposombläschen eingeschlossen enthält, die von einer micellaren Membranschicht umgeben ist, als Material zur Bildung der aus einer micellaren Membranschicht bestehenden Wandmembran des Liposoms ein Phospholipid verwendet wird, in dem Moleküle aus einer Fettsubstanz oder öligen Substanz vorliegen. Für das eine aktive Substanz enthaltende und unter Verwendung des angegebenen Materials erfindungsgemäß hergestellte Liposom ist dessen in emulgiertem Zustand vorliegender Komplex vom W/O/W-Typ charakteristisch (vergleiche Figur 1) und dessen ausgezeichnete Freisetzungverzögerungseigenschaft, aufgrund deren die im Liposombläschen eingeschlossene aktive Substanz langsam nach außen abgegeben wird beim Einbringen des Liposoms in einen lebenden Körper.

In Figur 1 bedeutet X eine hydrophile Gruppe, Y eine hydrophobe Gruppe, P ein Bläschen oder ein Innenhohlraum mit einem Gehalt

an einer wässrigen Lösung, A Moleküle von Fettsubstanz und Q eine außerhalb des Liposoms befindliche wässrige Lösung.

Das zur Herstellung des erfindungsgemäßen Liposoms verwendete Material enthält ein Phospholipid, mit dem Moleküle von Fettsubstanz vermischt oder an das derartige Moleküle gebunden sind. Der Typ des erfindungsgemäß verwendeten Phospholipids ist nicht sonderlich beschränkt, wenn es sich um ein solches handelt, das als Material zur Bildung einer Membranschicht von üblichen bekannten Liposomen eingesetzt wurde, und geeignete Verbindungen sind z.B. Lecithin, Phosphatidyläthanolamin, Lysolecithin, Lysophosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidyl-inosit, Sphingomyelin und Cardiolipin für sich allein oder im Gemisch miteinander, wobei gegebenenfalls auch eine Sterinverbindung wie Cholesterin enthalten sein kann.

Bei der im erfindungsgemäß verwendbaren Phospholipid vorliegenden Fettsubstanz handelt es sich um Triglycerid, Wachs oder Mineralöl oder um Gemische derselben, z.B. um pflanzliches Öl wie Sojabohnenöl, Baumwollsaamenöl und Sesamöl oder auch um Mineralöle, die aus Kohle oder Erdöl gewonnen sind.

Als besonders vorteilhaft erweist sich die Verwendung von rohem Lecithin für sich allein oder die Verwendung eines Gemisches aus rohem Lecithin und einer anderen öligen Substanz des angegebenen Typs.

Mit "Rohlecithin" wird hier und im folgenden eine Fraktion bezeichnet, die mit Chloroform oder einem Gemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis von 100:1 bis 3:2 eluiert wird, wenn eine an Phospholipid reiche Komponente einer Sub-

stanz wie Eigelb oder Sojabohnenöl durch Säulenchromatographie unter Verwendung von Aluminiumoxid als Säulenfüllungsmaterial fraktioniert wird, wobei die erhaltene Fraktion aus 97 bis 80 Gew.% reinem Lecithin und 3 bis 20 Gew.% öliger Substanz, z.B. Triglycerid oder Carotinoid besteht.

Wird zur Herstellung des erfindungsgemäßen Liposoms das angegebene Rohlecithin als Material für die Membranschicht verwendet, so wird der Gehalt an öliger Substanz im Rohlecithin so gesteuert, daß er in der gebildeten Wandmembran 3 bis 20 Gew.%, vorzugsweise 5 bis 15 Gew.% trägt. Dabei muß dafür gesorgt werden, daß der Gehalt an Fettsubstanz in der gebildeten Wandmembran 20 Gew.% nicht übersteigt, da andernfalls die Wandmembran verschlechtert und eine verminderte Ausbeute an Liposom erzielt wird. Ist andererseits der Gehalt an Fettsubstanz geringer als 3 Gew.%, so kann die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe nicht gelöst werden.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Liposoms können dem zur Bildung der Membranschicht dienenden Material als dritte Komponente Sterine beigemischt werden, z.B. Cholesterin und Ergosterin, sowie eine Substanz, die zur Änderung des elektrisch geladenen Zustands auf der Oberfläche des Liposoms befähigt ist, z.B. Phosphatidsäure, Dicetylphosphat oder Gangliosid von Rinderhirn zur Erzielung einer negativen Ladung, oder Stearylamin zur Erzielung einer positiven Ladung. Die Menge an zuzusetzender dritter Komponente ist je nach Eigenschaft des verwendeten Phospholipids leicht bestimmbar und als geeignet erweisen sich in der Regel 0 bis 10 Gew.%, bezogen auf das für die Bildung der Membranschicht verwendete Material.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Liposoms unter Verwendung eines Gemisches aus Phospholipid und öliger Substanz als Material

zur Bildung der Membranschicht sind übliche bekannte Methoden zur Liposomherstellung geeignet. So ist z.B. ein Verfahren verwendbar, bei dem aus dem angegebenen Material ein dünner Film gebildet wird und nach dem Inkontaktbringen der auf diese Weise erzeugten Membran mit einer kontinuierlichen Phase, welche eine aktive Substanz zur Bildung einer Dispersion durch Rühren enthält, das dispergierte System einer Ultraschallbehandlung unterworfen wird; oder ein Verfahren, bei dem nach dem Vermischen einer Lösung des angegebenen, zur Bildung der Membranschicht dienenden Materials in einem Lösungsmittel, das in Wasser unlöslich ist, mit einer wässrigen Lösung, welche die angegebene (wasserlösliche) aktive Substanz enthält, das erhaltene Gemisch einer Ultraschallbehandlung unterworfen wird zur Bildung einer Liposom-Vorläuferverbindung, worauf die die Vorläuferverbindung enthaltende Lösung einer Ultrazentrifugenbehandlung bei gleichzeitiger Anwesenheit eines wässrigen Mediums unterworfen wird; oder ein Verfahren, bei dem nach dem Überziehen der Oberfläche von Glaskörperchen und dergleichen mit dem angegebenen, zur Bildung der Membranschicht dienenden Material die überzogenen Körperchen mit einer die aktive Substanz enthaltenden wässrigen Lösung vermischt werden zum Eindispersieren der überzogenen Körperchen in die Lösung.

Die Menge an zur Herstellung des Liposoms für die Bildung der Membranschicht verwendetem Material beträgt 1 bis 500 mg/ml der Flüssigkeit, in welcher das Liposom suspendiert ist.

Nach den angegebenen Verfahren wird die Membranschicht des erhaltenen Liposoms aufgrund einer Wechselwirkung zwischen der hydrophoben Gruppe des Phospholipids, welches im Material für die Membranschicht, die das Liposom bildet, vorliegt, und den Molekülen der öligen Substanz, die in dem Material für die Membranschicht ebenfalls vorliegen, gebildet. Der

morphologische Zustand des erfindungsgemäßen Liposoms unterscheidet sich somit ganz wesentlich vom Zustand eines üblichen bekannten Liposoms, das eine Micelle aus gereinigtem Phospholipid aufweist.

Ferner verdient hervorgehoben zu werden, daß die ölige Substanz, die einen Bestandteil der Wandmembran des erfindungsgemäßen Liposoms bei dessen Herstellung aus dem zur Bildung der Membranschicht dienenden Material darstellt, eine Verbesserung der Liposom-Ausbeute und nach der Bildung des Liposoms eine leichte Abtrennung desselben bedingt sowie zu zahlreichen weiteren Vorteilen führt, z.B. zu einer Gleichförmigkeit der Partikelgröße der Liposomen und zu einer Verbesserung von deren Biegsamkeit und Schmiegsamkeit, zu einer Festigkeit der Wandmembran des Liposoms und zu einer langsamen Freisetzung der im Liposombläschen eingeschlossenen aktiven Substanz bei der Applizierung in einen lebenden Körper.

Bei der aktiven Substanz, insbesondere der physiologisch aktiven Substanz, die zur Herstellung des erfindungsgemäßen Liposoms Verwendung findet, handelt es sich z.B. um ein Arzneimittel, dessen nachteilige Nebenwirkungen vermindert und/oder dessen Wirkungsdauer im lebenden Organismus verbessert ist. Typische erfindungsgemäß verwendbare aktive Substanzen sind z.B. Peptidhormone wie Insulin, Oxytocin, Vasopressin, adrenocorticotropes Hormon (ACTH), luteinisierendes Hormon-freisetzendes Hormon (LH-RH), Carcitonin, Somatostatin, Steroidhormone wie Progesteron, Follikelhormon, Adrenocortinhormon und andere Hormone, wie Prostaglandin, Adenosin-3',5'-cyclisch-monophosphat, Antitumormittel wie Chlorambutyl, Streptozocin, Methothorexat, 5-Fluorouracil, Sitosin-arabinosit, Mitomycin C, Breomycin, Polysaccharidderivate, Antibiotika wie Penicillin, Cepharospolin, Streptomycin, enzymatische Zubereitungen wie Aminoglukosidase, Invertase und dergleichen.

Das erfindungsgemäße Liposom umfaßt Partikel von 0,01 bis 10 Mikron durchschnittlichem Durchmesser mit engem Verteilungsbereich des Partikeldurchmessers, wobei Partikel mit 0,5 bis 5 Mikron durchschnittlichem Durchmesser leicht unter Erzielung eines gleichförmigen Durchmessers erhalten werden können. Die erfindungsgemäßen Liposompartikel zeichnen sich durch eine ausgezeichnete Biegsamkeit und Geschmeidigkeit aus und sie können durch eine Zentrifugenbehandlung bei niedriger Geschwindigkeit von etwa 2000 bis etwa 4000 r.p.m. konzentriert werden. Außerdem erfolgt eine erneute Dispergierung nach der Konzentration durch einfaches kurzzeitiges Schütteln, ohne daß eine Ultraschallbehandlung erforderlich ist, um den ursprünglichen Zustand wieder herzustellen.

Das erfindungsgemäße Liposom zeichnet sich aufgrund der angegebenen speziellen Eigenschaften ferner dadurch aus, daß es die in seinem Liposombläschen eingeschlossene aktive Substanz, im Gegensatz zum bekannten Liposom vom Typ einer aus reinem Phospholipid bestehenden Micelle, in aktivem Zustand zu erhalten vermag, wobei als weiterer Vorteil seine Fähigkeit hinzukommt, die in ihm eingeschlossene aktive Substanz langsam freizusetzen. Das erfindungsgemäße Liposom ist daher besonders als Schutzsubstanz für ein instabiles Arzneimittel im lebenden Körper geeignet, und gleichermaßen für ein Arzneimittel, das bei einer unvermeidbar langdauernden Verabreichung oder hohen Dosierung Nebenwirkungen hervorruft. Aus den angegebenen Gründen ist es möglich, das erfindungsgemäße Liposom als Medizin zu verwenden.

Wird z.B. das erfindungsgemäße Liposom als Insulininjektion angewandt, so bewirkt eine intramuskuläre Verabreichung des erfindungsgemäßen Liposoms einmal während zwei bis sieben Tagen bei einer Dosierung von 0,2 bis 20 mg, berechnet als Insulin,

an einen Erwachsenen den gleichen Effekt wie die direkte intramuskuläre Verabreichung von freiem Insulin dreimal täglich in einer Einzeldosis von etwa 0,03 bis 4,0 mg (ein Drittel von 0,1 bis 4,0 mg).

Wird das erfindungsgemäße Liposom als Medizin eingesetzt, so ist dessen Verabreichung in verschiedener Weise möglich, z.B. percutan, subcutan, intramuskulär, intraperitoneal, intravenös, intrarectal und topisch, wobei die subcutane oder topische Verabreichung bevorzugt wird. Die Menge an verabreichtem Produkt hängt natürlich vom Verfahren und der Art der Verabreichung, dem Typ der aktiven Substanz und der Dauer der Behandlung ab, doch ist diese Menge in der Regel 0,1 bis 1 mal so groß wie die Menge an aktiver Substanz, die pro Tag direkt verabreicht wird, wobei ferner der Intervall zwischen den einzelnen Tagen verlängert werden kann.

Das erfindungsgemäße Liposom kann auch als Injektion verabreicht werden nach Dispersion des Liposoms in einer wässrigen physiologischen Kochsalzlösung. Insbesondere dann, wenn das erfindungsgemäße Liposom eine peptidische physiologisch aktive Substanz, z.B. ein Peptidhormon, enthält, wird eine besonders vorteilhafte Wirkung bei subcutaner oder intramuskulärer Injektion erhalten. Da peptidische physiologisch aktive Substanzen im lebenden Körper in der Regel rasch abgebaut werden, erweist sich eine häufige Verabreichung (Injektion) zur Aufrechterhaltung der Wirkung der Substanz als erforderlich, was nicht nur zu einer schwereren Belastung des Patienten, sondern auch zu starken Konzentrationsschwankungen der aktiven Substanz im Blut führt. Aufgrund dieser Gegebenheiten wird die Wirkung der Verabreichung der aktiven Substanz vermindert und Nebenwirkungen der aktiven Substanz sind die Folge.



Es ist daher von Vorteil, daß, wie in den unten aufgeführten Beispielen gezeigt wird, das erfindungsgemäße Liposom eine hervorragend langsame Freisetzung der in ihm eingeschlossenen aktiven Substanz bewirkt bei subcutaner oder intramuskulärer Injektion, so daß die Zahl der Verabreichungen wesentlich vermindert werden kann unter Aufrechterhaltung einer gleichförmigen Konzentration der peptidischen physiologisch aktiven Substanz im Blut, was zur Folge hat, daß die Wirkung der aktiven Substanz voll zur Geltung kommt und deren Nebenwirkungen unterdrückt werden.

Tests zur Bestimmung der aktiven Toxizität des zur Herstellung des erfindungsgemäßen Liposoms verwendeten Materials unter Verwendung von Ratten bei subcutaner und intravenöser Injektion zeigten solange keine toxischen Befunde an den behandelten Ratten, bis die angewandte Dosierung 1000 mg/kg des betreffenden Materials erreicht hatte, woraus sich ergibt, daß das erfindungsgemäße Liposom als Medizin vom Standpunkt der Wandmembran des Liposoms sicher anzuwenden ist.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

#### Beispiel 1

Eine Lösung mit einem Gehalt an 100 mg handelsüblichem rohem Eigelb-Lecithin (Handelsprodukt der Merck Company), 11,6 mg Cholesterin und 2,7 mg Stearylamin in 10 ml Chloroform wurde in einen 25 ml-Rundkolben eingebracht, der sich auf einem Rotationsverdampfer befand, und durch Abdestillieren der Chloroformlösung unter Rotation des Verdampfers bei einer Temperatur von 38°C unter vermindertem Druck wurde auf der Innenwand des Kolbens ein Film gebildet. Danach wurde 1 ml einer 1 Gew.-%igen wässrigen Lösung von Adenosin-3',5'-cyclisch-monophosphat (im folgenden als C-AMP abgekürzt) in den Kolben

eingebracht und durch Schütteln des Kolbens während 30 min löste sich der Film von der Innenwand des Kolbens ab und der Film wurde in der Lösung dispergiert. Durch Behandlung der Dispersion mit einer Ultraschall-Behandlungsapparatur (Handelsprodukt der Nippon Seiki Company, Modell NS 200-2) während 20 min wurde eine Suspension-Dispersion von Partikeln mit 1 bis 2 <sup>µm</sup> Mikron durchschnittlichem Partikeldurchmesser erhalten. Als nächste Verfahrensstufe wurde eine wässrige, physiologische Kochsalzlösung, die das 6-fache Volumen der angegebenen Suspension-Dispersion hatte, zu dieser Suspension-Dispersion zugegeben und das Gemisch wurde dreimal einer Zentrifugentrennung bei 3000 r.p.m. jeweils 10 min lang unterworfen, um das gebildete Liposom 1 - 1 vollständig abzutrennen von der restlichen Lösung von C-AMP, die vom Liposom nicht aufgenommen worden war.

Zu Vergleichszwecken wurden vier Arten von Liposomen hergestellt unter Verwendung der in der unten angegebenen Tabelle 1 aufgeführten Materialien als Vergleichsbeispiele 1 - 2, 1 - 3, 1 - 4 und 1 - 5 nach der gleichen Verfahrensweise wie gemäß 1 - 1.

Die Einschlußrate an C-AMP, d.h. die in Gewichtsprozent angegebene Menge an C-AMP, die im Liposombläschen vorliegt, zur angewandten Menge an C-AMP, sowie das Ausmaß der Freisetzung von C-AMP aus dem Liposom, nachdem dieses 24 h lang bei einer Temperatur von 37°C gehalten wurde, d.h. der restliche Prozentgehalt an Liposom, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Wie die Ergebnisse der Tabelle 1 zeigen, wird bei Verwendung von Rohlecithin als Material für die Membranschicht ein erfindungsgemäßes Liposom mit verbesserter Einschlußrate und verbesserter Restmenge im Liposombläschen im Vergleich

zu den entsprechenden Werten von Liposomen, die unter Verwendung üblichen bekannten Materials für die Membranschicht gewonnen sind, erhalten.

Tabelle 1: Einschlußrate und restlicher Prozentgehalt

Produkt	Bezeichnung	Zusammensetzung des Materials für die Membran	Einschlußrate (%)	restlicher Prozentgehalt an C-AMP im Liposombläschen
erfindungs- gemäß	1 - 1	Rohlecithin (+) 100 Cholesterin 11.6 Stearylamin 2.7	28	99.2
	1 - 2	gereinigtes Lecithin (+) 100 Cholesterin 11.6 Stearylamin 2.7	1.0	89.0
	1 - 3	gereinigtes Lecithin 100 Stearylamin 2.7	3.4	88.9
gemäß Vergleichs- beispielen	1 - 4	gereinigtes Lecithin 100 Cholesterin 11.6	0.6	84.2
	1 - 5	gereinigtes Lecithin 100	1.6	84.3

(+) Handelsprodukt

Die Zusammensetzung des handelsüblichen Rohlecithins (Handelsprodukt der Merck Co.) und des handelsüblichen gereinigten Lecithins (Handelsprodukt der Sigma Co.) war wie folgt (Angaben in Gewichtsprozent):

Produkt	Phospholipid	Cholesterin	Ölsubstanz
Rohlecithin	93,8	1,1	5,1
gereinigtes Lecithin	99,5	0,3	0,2

#### Beispiel 2

Es wurden Liposomen hergestellt nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren, jedoch mit der Ausnahme, daß anstelle der wässrigen C-AMP-Lösung 1 ml einer 20 Gew.-%igen wässrigen Glukoselösung sowie die in der folgenden Tabelle 2 aufgeführten Materialien für die Membranschicht verwendet wurden.

Die Beziehung zwischen der Menge an Baumwollsaamenöl als Komponente der zur Bildung der Membranschicht dienenden Materialien und der Ansammlungs- oder Einschlußrate an Glukose in den Liposomen ist in Figur 2 graphisch dargestellt.

Der in Prozent ausgedrückte Restgehalt an Glukose im Liposom, bezogen auf den Anfangsgehalt der Glukose im Liposom, nachdem dieses 24 h lang bei einer Temperatur von 37°C gehalten wurde, ist in Figur 3 graphisch dargestellt, wobei diese Bestimmungen des Glukosegehalts an den Liposomproben 2 - 7, 2 - 8 und 2 - 9 durchgeführt wurden.

Aus diesen Figuren ist die Überlegenheit des erfindungsgemäßen Liposoms über übliche bekannte Liposome klar ersichtlich.

Tabelle 2  
Zusammensetzung der Materialien für die  
Membranschichten

Produkt	Bezeichnung	Membranmaterial	
		Grundmaterial (mg)	Baumwollsaamenöl (mg)
erfindungsgemäß	2 - 1	Rohlecithin (+) 100	0
	2 - 2	"	5
	2 - 3	"	10
	2 - 4	"	15
	2 - 5	"	20
gemäß Vergleichs- beispiel	2 - 6	"	40
	2 - 7	gereinigtes Lecithin (+) 100	0
erfindungsgemäß	2 - 8	"	5
	2 - 9	"	10
	2 - 10	"	15
	2 - 11	"	20
gemäß Vergleichs- beispiel	2 - 12	"	40

(+) Handelsprodukt

Beispiel 3

Unter Verwendung der in der unten angegebenen Tabelle 3 aufgeführten Materialien für die Membranschicht wurden unter Verwendung des in Beispiel 1 beschriebenen Verfahrens Filme auf der Innenwand eines Rundkolbens gebildet. Nach Zugabe von 1 ml einer wässrigen Zitronensäure-Pufferlösung, die pro 10 ml Lösung (pH 2,3) 10 mg Insulin enthielt, zu dem Kolben wurde eine Suspension-Dispersion von Liposom-Partikeln mit 1 bis 2 <sup>µm</sup> Mikron Durchmesser nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren hergestellt. Nachdem die Suspension-Dispersion bei Raumtemperatur 24 h lang stehen gelassen wurde, wurde sie mit 6 ml einer wässrigen physiologischen Kochsalzlösung und dem doppelten Volumen eines 6:1 Gemisches aus einer physiologischen Kochsalzlösung und einer wässrigen Zitronensäure-Pufferlösung versetzt und einer Zentrifugenbehandlung zur Liposomengewinnung unterworfen.

Tabelle 3

Produkt	Bezeichnung	Zusammensetzung des Materials für die Membranschicht			
gemäß Vergleichsbeispiel	3 - 1	handelsüblich, gereinigtes Lecithin	Cholesterin 11,6 mg	Stearylamin 2,7 mg	Baumwollsaamenöl 0 mg
erfindungsgemäß	3 - 2	wie oben	wie oben	wie oben	Baumwollsaamenöl 6 mg
"	3 - 3	wie oben	wie oben	wie oben	Baumwollsaamenöl 12 mg
"	3 - 4	handelsüblich, rohes Lecithin 100 mg	wie oben	wie oben	Baumwollsaamenöl 0 mg

030046/0850



Nach Zugabe einer wässrigen Zitronensäure-Pufferlösung zu dem auf diese Weise hergestellten Liposom unter Einstellung der Insulinkonzentration des Gemisches auf 40 IU/ml (IU = internationale Standardeinheit) wurde mit dem Gemisch der folgende Versuch durchgeführt.

Zur Bestimmung der Wirkungsdauer von Insulin-Liposom im lebenden Körper wurden vier Gruppen von weiblichen SD-Ratten, in denen durch Verabreichung von Streptozocin künstlich Diabetes hervorgerufen worden war, subcutan mit dem wie angegeben hergestellten Liposom injiziert und deren Blutzucker wurde vor und nach der Injektion des Liposoms bestimmt. Figur 4 zeigt den Verlauf der Blutzuckerwerte mit der Zeit, wobei auf der Ordinate der Prozentgehalt der Glukosekonzentration im Blut nach der Injektion zur Konzentration der im Blut befindlichen Glukose vor der Injektion, und auf der Abszisse die Tage nach der Injektion aufgetragen sind.

Wie aus Figur 4 ersichtlich, ist die Wirkung des Insulins im Körper der Ratte (in anderen Worten, der Befund, daß verminderte Glukosewerte über einen langen Zeitraum aufrechterhalten wurden) aufgrund der Verabreichung des erfindungsgemäßen Liposoms, zu dessen Herstellung Rohlecithin, das von Haus aus ölige Substanz enthält, diene, weit überlegen dem entsprechenden Wert, der aus der Verabreichung von üblichem bekanntem Liposom resultiert, zu dessen Herstellung gereinigtes Lecithin, das die ölige Substanz nicht enthält, verwendet wurde.

#### Beispiel 4

Dieses Beispiel zeigt den Übergang der im Liposombläschen eingeschlossenen aktiven Substanz nach der Verabreichung in den lebenden Körper. Es wurden die folgenden Versuche

durchgeführt unter Verwendung eines Liposoms, das Tritium-markiertes luteinisierendes Hormon-freisetzendes Hormon (LH-RH) als aktive Substanz enthielt. Das Liposom wurde wie folgt hergestellt.

#### Herstellung des Liposoms

Nach dem gleichen Verfahren, wie es in Absatz 1 des Beispiels 1 beschrieben ist, wurde ein aus rohem Eigelb-Lecithin, Cholesterin und Stearylamin bestehender Film auf der Innenwand eines Rundkolbens hergestellt. In den Kolben wurde 1 ml einer wässrigen physiologischen Kochsalzlösung, welche Tritium-markiertes LH-RH (im folgenden und in den Figuren 5 bis 8 als  $^3\text{H-LH-RH}$  abgekürzt) ( $250 \mu\text{Ci}/7,3 \mu\text{g}$ , hergestellt von der New England Nuclear Company) mit einer Rate von  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  eingebracht und nach dem Ablösen und Dispergieren des Films von der Innenwand des Kolbens durch 30 min langes Schütteln des Kolbens wurde die auf diese Weise gebildete Dispersion in einer Ultraschallbehandlungsgaratur (vergleiche Beispiel 1) 15 min lang behandelt zur Herstellung einer Suspension-Dispersion von Partikeln mit 1 bis  $2 \mu\text{m}$  durchschnittlichem Teilchendurchmesser. Das 6-fache Volumen einer wässrigen physiologischen Kochsalzlösung, bezogen auf die Suspension-Dispersion, wurde zur Suspension-Dispersion zugegeben und durch zweimalige Trennbehandlung des Gemisches in einer Zentrifuge bei 3000 r.p.m. jeweils 10 min lang wurde das auf diese Weise hergestellte Liposom vollständig von der Lösung von  $^3\text{H-LH-RH}$ , die in das Liposomenbläschen nicht aufgenommen worden war, abgetrennt.

Die Rate an gesammeltem  $^3\text{H-LH-RH}$  betrug 10 Gew.%. Nach Einstellen der Konzentration des  $^3\text{H-LH-RH}$  auf  $3,42 \mu\text{Ci}/\text{ml}$  durch Zugabe einer wässrigen physiologischen Kochsalzlösung, wurde die erhaltene Lösung zur Durchführung der folgenden Versuche verwendet.

#### Versuch 1

Das gewonnene Liposom bzw. das freie, im Liposom nicht eingeschlossene  $^3\text{H}$ -LH-RH wurde jeweils subcutan einer männlichen ICR-Maus mit 30 bis 32 g Körpergewicht, wobei jede Gruppe von Versuchstieren aus 3 Mäusen bestand, in einer Dosierungsrate von  $0,34 \mu\text{Ci/Versuchstier}$  injiziert und der Gehalt an  $^3\text{H}$ -LH-RH (ausgedrückt als Menge des Radioisotops RI) im Blut jedes Versuchstiers wurde von Zeit zu Zeit bestimmt durch Entnahme von jeweils 0,25 ml Blutprobe von jedem Tier in einem vorbestimmten Zeitintervall, wobei nach der Behandlung der Probe mit einem Probe-Oxidationsmittel (hergestellt von der Packard Company) die Radioaktivität mit Hilfe eines flüssigen Scintillationszählers festgestellt wurde.

Die Ergebnisse der Bestimmungen sind in Figur 5 aufgeführt, wobei der Gehalt an  $^3\text{H}$ -LH-RH in der Blutprobe nach 15 min ab Verabreichung als 100 angesetzt wurde.

Wie aus Figur 5 ersichtlich, wird das im Bläschen des erfindungsgemäßen Liposoms eingeschlossene Hormon langsam im lebenden Körper freigesetzt.

#### Versuch 2

Das angegebene Liposom bzw. das freie  $^3\text{H}$ -LH-RH wurden jeder männlichen SD-Ratte einer jeweils aus 3 Tieren bestehenden Gruppe subcutan injiziert und die Menge an im Urin und den Faeces ausgeschiedenem Radioisotop wurde von Zeit zu Zeit bestimmt. Die Verabreichungsdosis betrug  $0,68 \mu\text{Ci/Versuchstier}$  und die ausgeschiedene Menge an Radioisotop wurde durch Scintillationszählung der Probe nach dem Verdünnen der Urinprobe mit destilliertem Wasser auf 100 ml bzw. nach dem Trocknen der Faeces und deren Oxidation bestimmt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Figur 6 gezeigt, wobei die verabreichte Menge als 100 gesetzt und die ausgeschiedene Menge gegen die Zeit aufgetragen wurden. In den Faeces wurde kein Radioisotop festgestellt.

Aus Figur 6 ist ersichtlich, daß das im erfindungsgemäßen Liposom eingeschlossene Hormon aus dem Liposom langsam in den lebenden Körper freigesetzt wird.

### Versuch 3

Das gleiche Liposom wie in den Versuchen 1 und 2 bzw. freies <sup>3</sup>H-LH-RH wurde subcutan jeder männlichen ICR-Maus mit einem Körpergewicht von 30 bis 32 g jeder aus zwei Mäusen bestehenden Versuchstiergruppe injiziert und die Restmenge an Radioisotop an der Injektionsstelle wurde zu bestimmten Zeiten nach der Verabreichung von 0,165 µCi bestimmt. Die Bestimmung der Restmenge an Radioisotop erfolgte in der Weise, daß der Injektionsbereich herausgenommen und in SOLUENE (Produkt der Packard Company) gelöst wurde, worauf eine Scintillationszählung durchgeführt wurde.

Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten: Wie in Figur 7 gezeigt, nimmt nach der Injektion von freiem <sup>3</sup>H-LH-RH die Restmenge an Radioisotop RI bemerkenswert schnell innerhalb kurzer Zeit nach der Injektion ab, wohingegen, wie aus Figur 8 ersichtlich, eine extrem langsame Verminderung erfolgt, wenn das Hormon in solcher Weise verabreicht wird, daß es im Bläschen des Liposoms eingeschlossen ist.

Die Ergebnisse der Versuche 1 bis 3 lassen somit die langsame Freisetzung der im Bläschen des erfindungsgemäßen Liposoms eingeschlossenen aktiven Substanz klar erkennen.

26.  
Leerseite

3016976

33.

Nummer:

30 16 976

Int. Cl. 2:

B 01 J 13/02

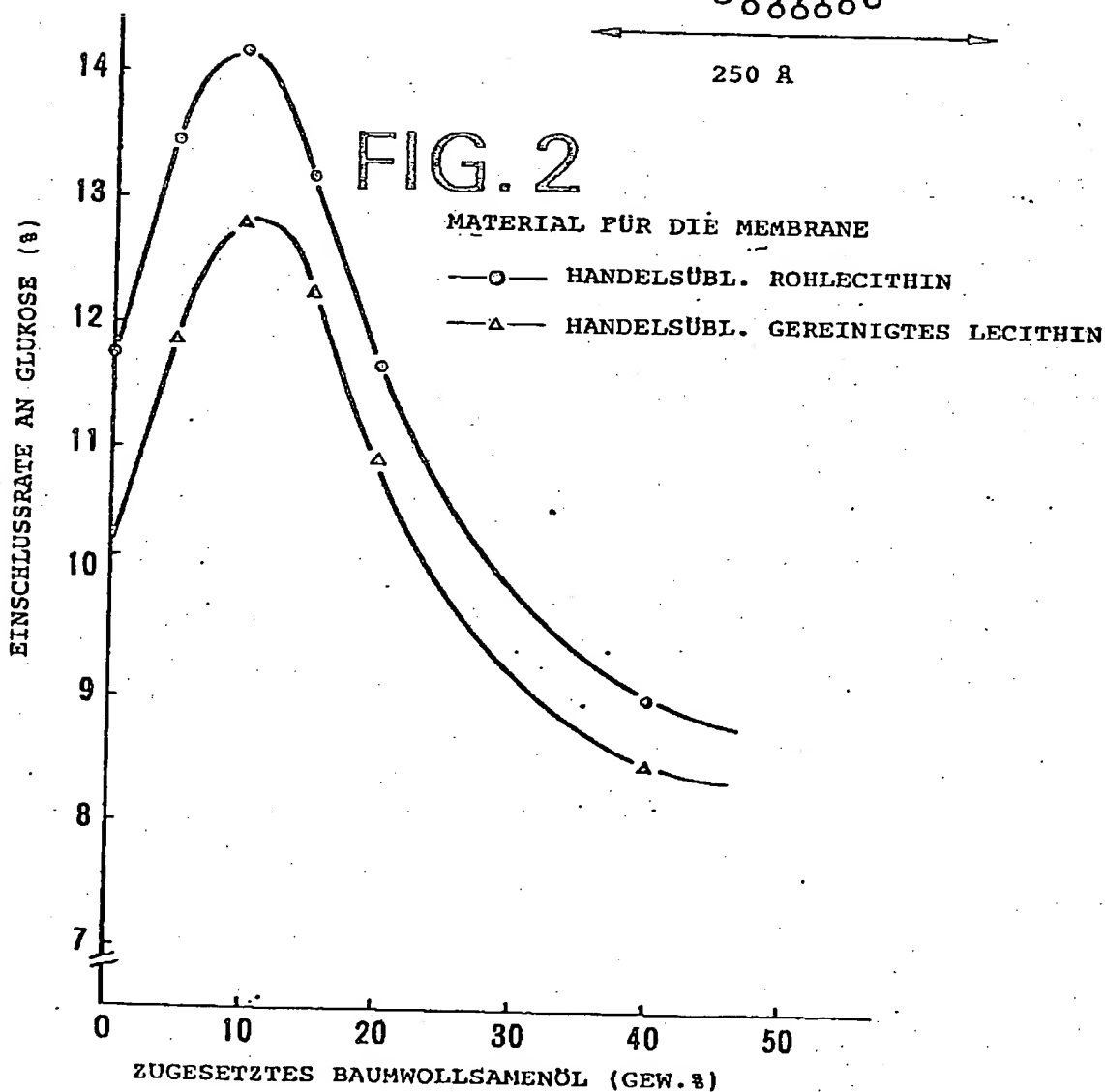
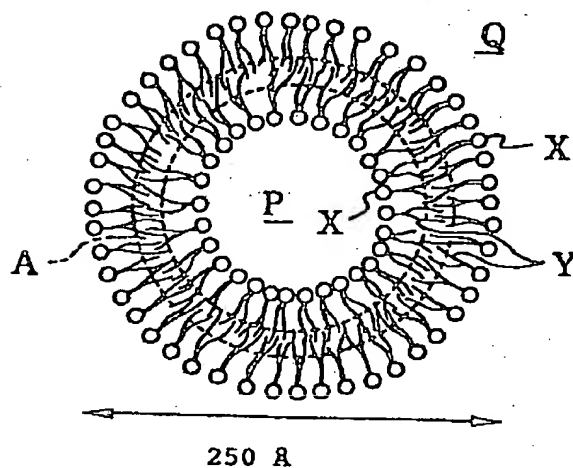
Anmeldetag:

2. Mai 1980

Offenlegungstag:

13. November 1980

FIG. 1

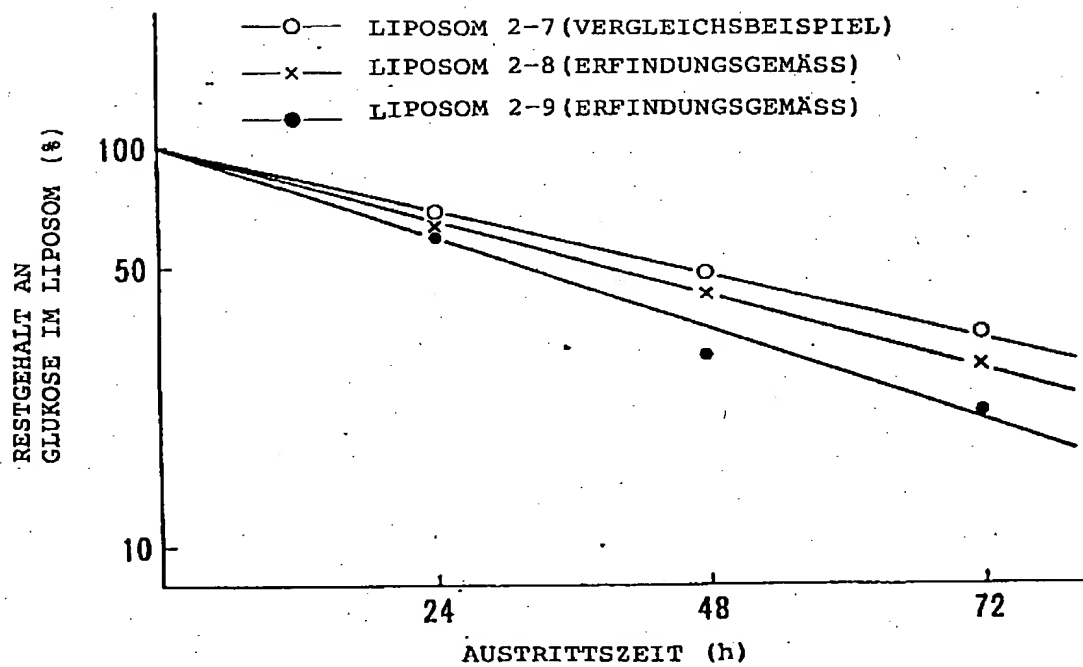


030046/0850

26. 27.

3016976

FIG. 3 PERMEABILITÄT VON GLUKOSE

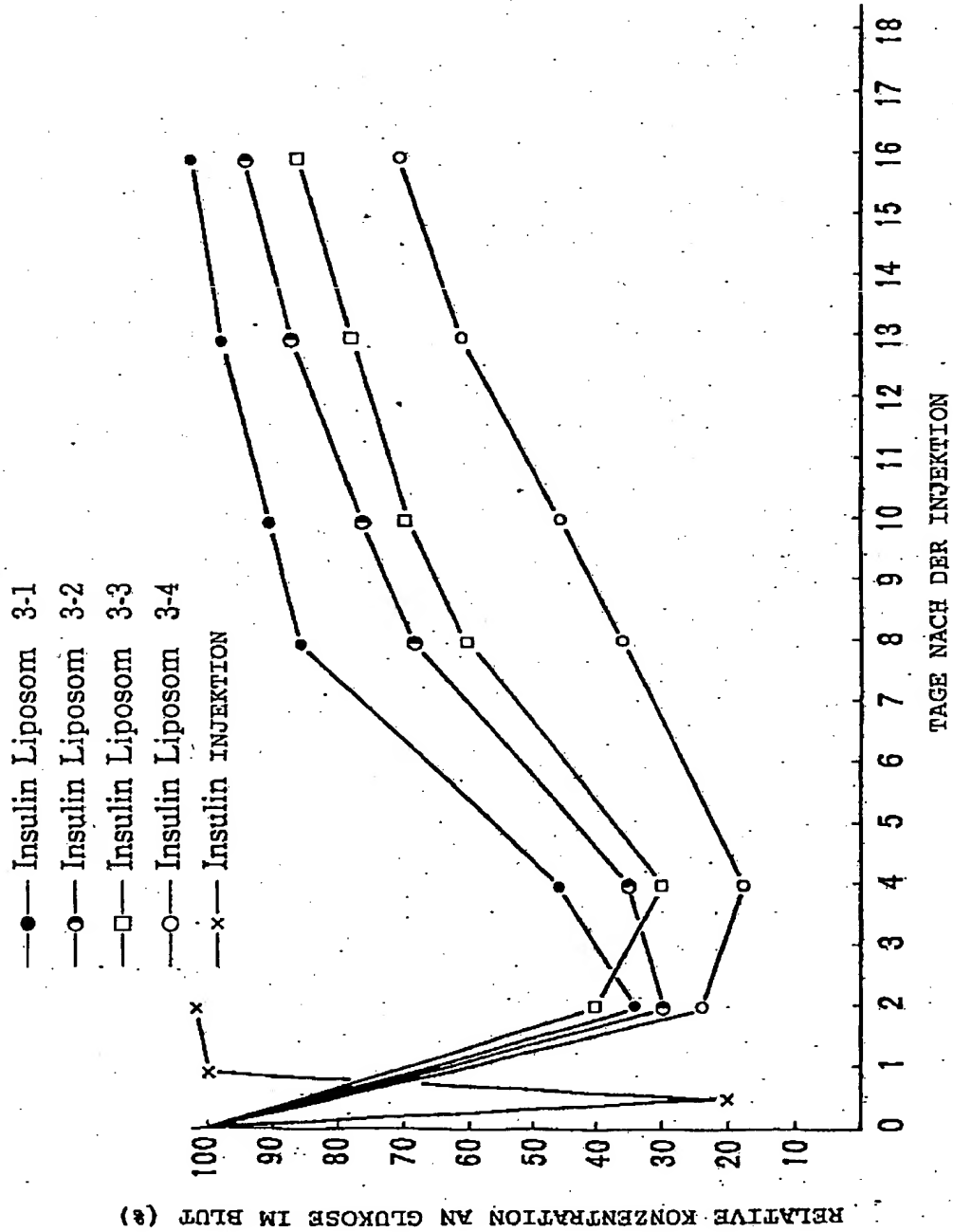


030046/0850

47. 28.

3016976

FIG. 4  
WIRKUNGSDAUER DER AKTIVEN SUBSTANZ (INSULIN)  
IM LEBENDEN KÖRPER



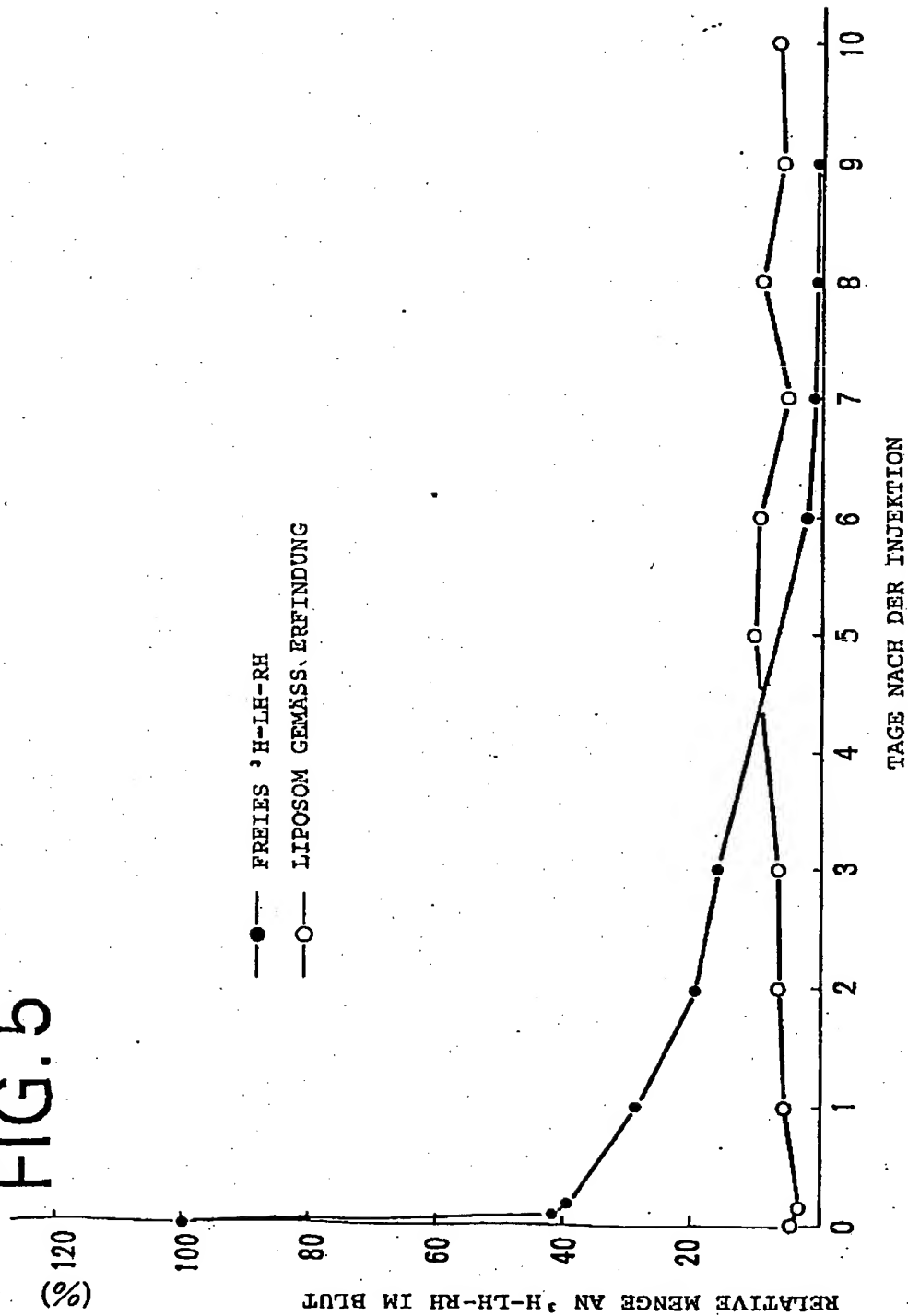
035046/0850



28. 29.

3016976

FIG. 5

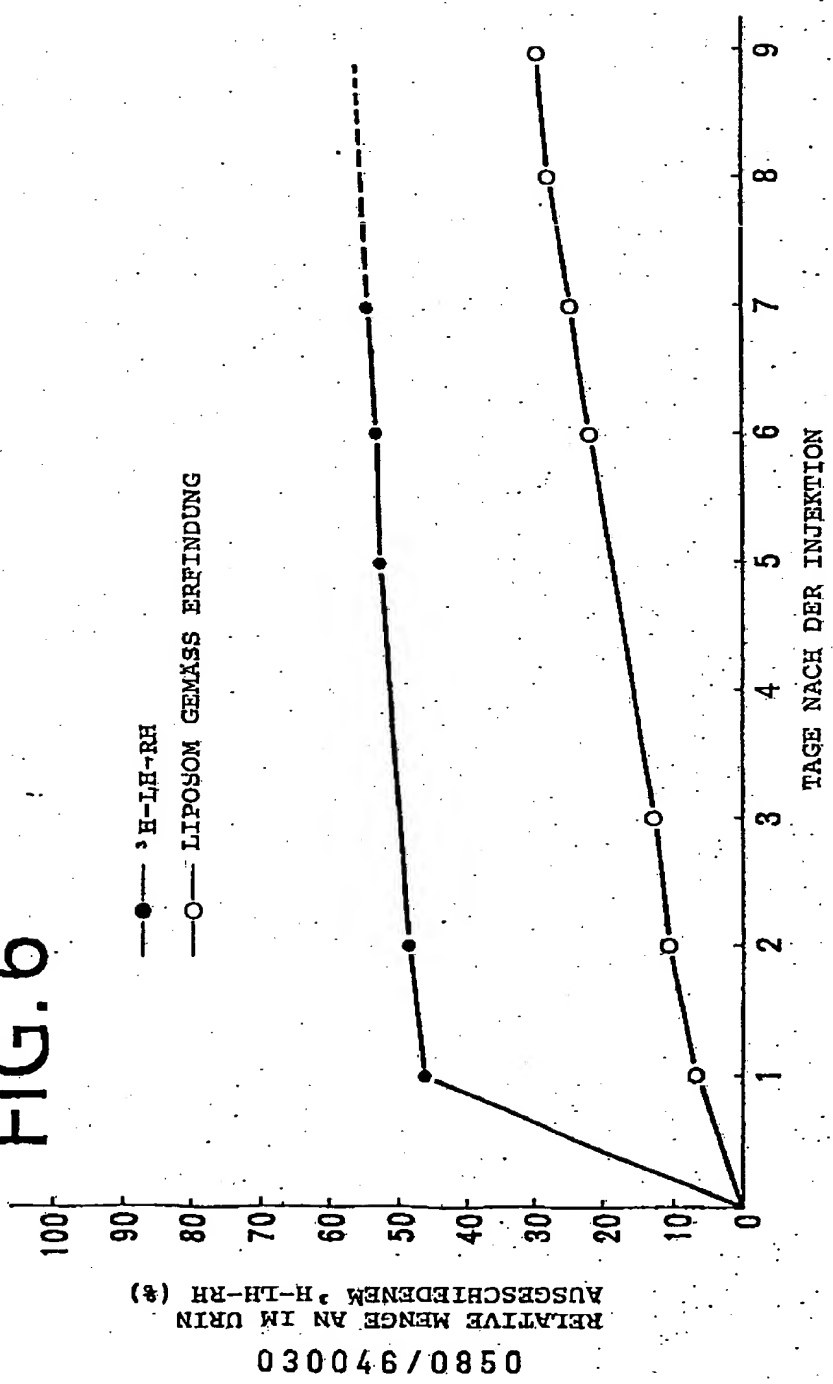


030046/0850

~~29.~~ 30

3016976

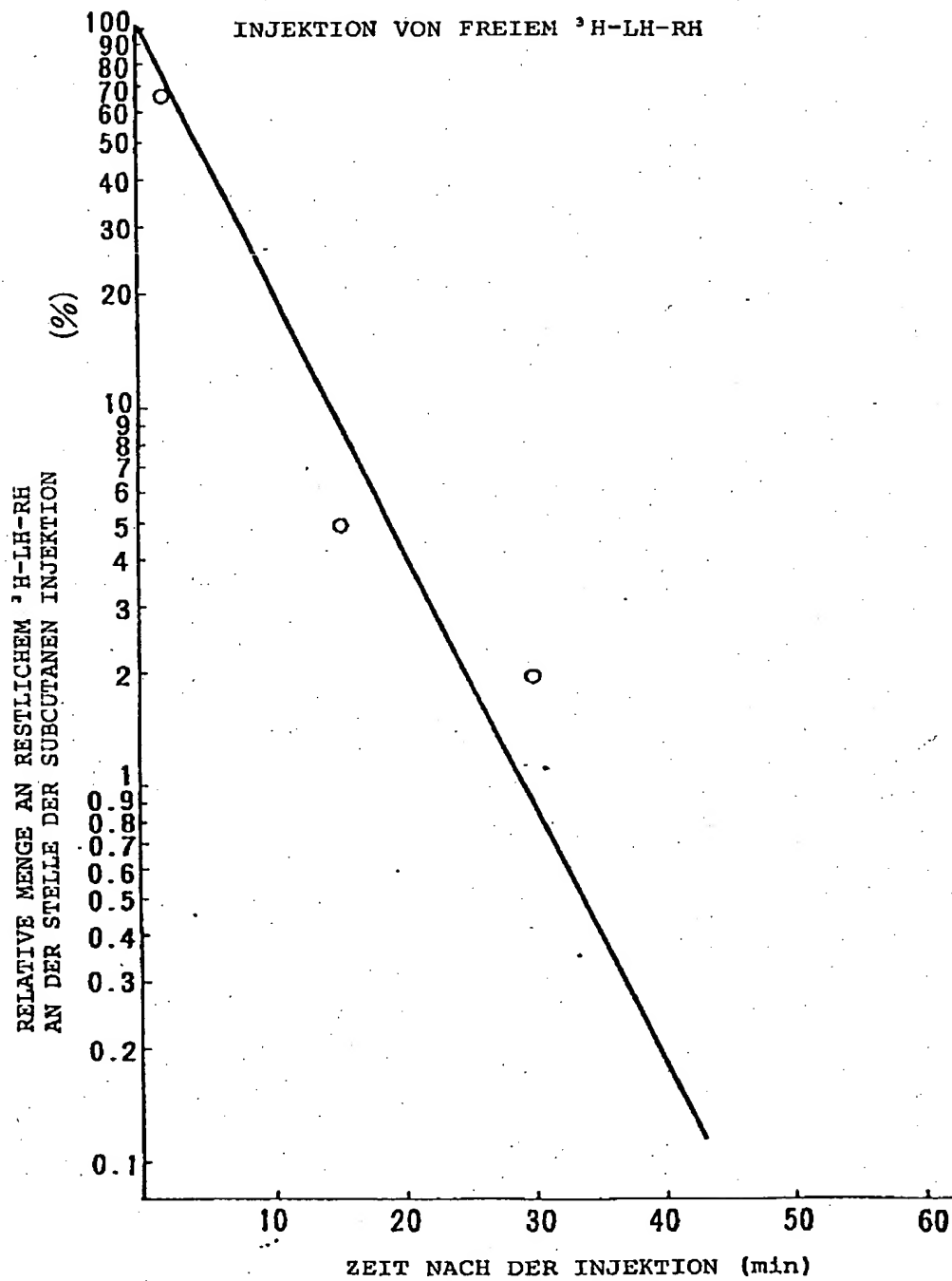
FIG. 6



3016976

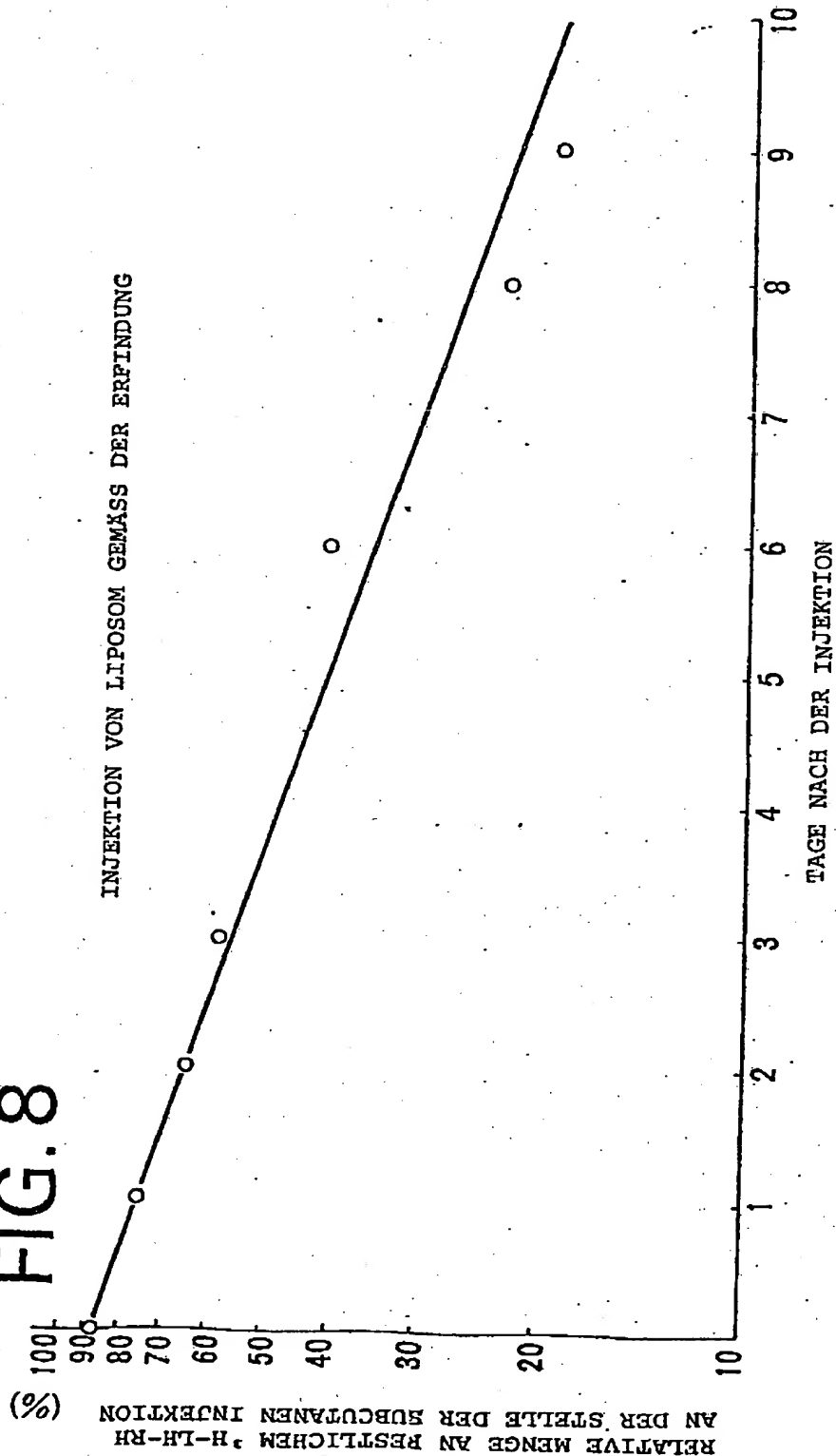
~~30.~~ 31.

FIG. 7



030046/0850

FIG. 8



030046/0850

~~34.~~ 32.

3016976